

DERWENT- 2004-171855
ACC-NO:

DERWENT- 200417
WEEK:

COPYRIGHT 2008 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Novel membrane-bound cyclic alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria and another aerobic Gram-negative bacteria, is useful for producing cyclic ketone from cyclic alcohol

PATENT-ASSIGNEE: YAMAGUCHI TLO YG[YAMAN]

PRIORITY-DATA: 2001JP-0384688 (December 18, 2001)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 2003180343 A	July 2, 2003	N/A	012	C12N 009/04

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
JP2003180343A	N/A	2001JP-0384688	December 18, 2001

INT-CL (IPC): C12N009/04, C12P007/26, C12P041/00

ABSTRACTED-PUB-NO: JP2003180343A

BASIC-ABSTRACT:

NOVELTY - A membrane-bound cyclic alcohol dehydrogenase (MCAD) (I) of acetic acid bacteria and another aerobic Gram-negative bacteria, is new.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are included for the following:

(1) producing (M1) cyclic ketone and secondary ketone from cyclic alcohol and secondary alcohol, respectively using (I); and

(2) isolating (M2) optical isomers involves oxidizing only one optical isomer of a racemic mixture using (I) and separating the optical isomers which are not oxidized.

USE - (I) of Gluconobacter genus, preferably Gluconobacter frateurii CHM9 strain is useful for producing cyclic ketone and secondary ketone from cyclic alcohol and secondary alcohol, respectively. (I) is also useful in isolating optical isomers e.g., 2,3 butanediol (claimed).

ADVANTAGE - (I) has high enzyme activity (100 times greater) in the presence of coenzyme PQQ than cytoplasm cyclic alcohol dehydrogenase (CCAD). (I) is easily solubilized and purified. The optical isomers can be separated very easily by (I).

DESCRIPTION OF DRAWING(S) - The figure shows graph representing the elution profile of membrane-coupled cyclic alcohol dehydrogenase enzyme (MCAD) from Gluconobacter frateurii CHM9 by CM-Toyopearl column chromatography.

CHOSEN- Dwg. 3/6
DRAWING:

TITLE- NOVEL MEMBRANE BOUND CYCLIC ALCOHOL DEHYDROGENASE ACETIC
TERMS: ACID BACTERIA AEROBIC GRAM NEGATIVE BACTERIA USEFUL PRODUCE
CYCLIC KETONE CYCLIC ALCOHOL

DERWENT-CLASS: D16 E19

CPI-CODES: D05-A02A; D05-C15; E10-F02A1; E10-F02B; E11-M;

CHEMICAL- Chemical Indexing M3 *01* Fragmentation Code G030 G553 J5 J561 M280 M320 M415
CODES: M510 M520 M530 M541 M720 M904 M905 M910 N134 N242 N343 Specific Compounds
01008K 01008P Registry Numbers 1008P 1008U

Chemical Indexing M3 *02* Fragmentation Code G030 G530 G543 G553 G563 G573 G583
J5 J561 M280 M320 M415 M510 M520 M530 M541 M720 M904 M905 N134 N242 N343
Ring Index 00417 Markush Compounds 200122-70001-K 200122-70001-P

Chemical Indexing M3 *03* Fragmentation Code J5 J581 M210 M211 M212 M213 M214
M215 M216 M220 M221 M222 M223 M224 M225 M226 M231 M232 M233 M262 M282
M320 M416 M620 M720 M904 M905 N134 N242 N343 Markush Compounds 200122-70002-
K 200122-70002-P

UNLINKED-DERWENT-REGISTRY-NUMBERS: ; 1008P ; 1008U

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C2004-068195

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]**[0001]**

[Field of the Invention] It is related with the film joint mold cyclic alcohol dehydrogenase (MCAD) which exists in the cell membrane of acetic bacteria, especially the acetic bacteria of *Gluconobacter* and which uses PQQ as a coenzyme.

[0002]

[Description of the Prior Art] Acetic bacteria and others *Pseudomonas* Although existence of the cytoplasm mold cyclic alcohol dehydrogenase (CCAD) of an NAD dependency is known by cytoplasm, such as ****, the cyclic alcohol dehydrogenase activity of CCAD is very low. Moreover, it is this invention although CCAD which exists in the cytoplasm of the acetic bacteria of *Gluconobacter* also has cyclic alcohol dehydrogenase activity. As compared with the film joint mold cyclic alcohol dehydrogenase (MCAD) which uses pyrroloquinoline quinone (PQQ) as a coenzyme, 100 times were also only low activity. Therefore, it is a kino protein to the oxidative fermentation process for manufacturing the oxidation product of cyclic alcohol industrially. Using alcoholic dehydrogenase (ADH) and CCAD has a problem in respect of productive efficiency.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Conventional ADH and CCAD are enzymes with which MCAD(s) which exist in the cell membrane of acetic bacteria, especially the acetic bacteria of *Gluconobacter*, and which use PQQ as a coenzyme differ, and it is a technical problem to show clearly that it is suitable for manufacture of the oxidation product of cyclic alcohol, the 2nd class alcohol, etc.

[0004]

[Means for Solving the Problem] Research of a large number about oxidization by the microorganism of cyclic alcohol or oxidization by the enzyme has been done using various bacteria. Those most relate to *Pseudomonas* (*Pseudomonas*) or the NAD dependency cyclohexanol dehydrogenase (EC 1.1.1.245) of the *Acinetobacter* (*Acinetobacter*) origin. Moreover, cyclohexanol oxidation has been studied in the process of a cyclohexane metabolic turnover. The gene analysis of the gene cluster for cyclohexanol oxidization was studied in *Acinetobacter*.

[0005] It is proposed that the reduction to the cyclohexanol of the cyclohexane by NAD dependency cyclohexanol dehydrogenase produces a cyclohexanol by coupling with hydroxylase. This is the same case as an annular ketone reductase or an annular aldehyde reductase. In early research, the NADPH dependency acetone reductase which produces isopropanol was reported. The same ketone reductase is reported also in the mammals. It was proved that the Aldo-keto reductase of a large number which carry out the catalyst of the unsymmetrical reduction of a carbonyl compound is useful to composition of an optically active compound.

[0006] The cyclopentanol oxidation by the microorganism is also studied about *Pseudomonas*, and it is shown that NAD dependency dehydrogenase (EC 1.1.1.163) is an enzyme which is acting in the step of the beginning of the oxidative degradation of cyclic alcohol. Cyclohexanol oxidation is observed also in the 2nd class alcohol acid-ized enzyme of the *Pseudomonas* origin again, and the flavin dependency enzyme which produces a hydrogen peroxide is functioning.

[0007] myo-inositol It is related. cyclitol etc. -- the enzyme which carries out the catalyst of the oxidation is also known as an NAD dependency enzyme in many reference. However, since nothing is reported about MCAD, no information exists about the function, the localization site, the catalyst-property, physicochemical quality, and physiological function of MCAD.

[0008] this invention persons pointed out to the cell membrane of an aerobic bacterium existence of the oxidation activity which uses PQQ as a coenzyme for the first time. Then, as a result of screening the production stock of MCAD for 100 or more shares of cell strains containing other aerobic bacteria of acetic bacteria, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*,

and varieties, MCAD which exists in the cell membrane of acetic bacteria, especially the acetic bacteria of *Gluconobacter* and which uses PQQ as a coenzyme was found out, and solubilization and purification were performed for the first time.

[0009] *Gluconobacter frateurii* CHM 9 The property of MCAD is expressed below as an example of representation of MCAD of this invention. Although named the cyclic alcohol dehydrogenase which exists in the cell membrane of acetic bacteria and which uses PQQ as a coenzyme, MCAD oxidizes in cyclic alcohol widely, and also is an enzyme with which the 2nd class alcohols also oxidize, and has large substrate specificity. It became clear that CCAD which exists in the cytoplasm already known was a new enzyme which thinks from an intracellular existence part, substrate specificity, a dynamical property, etc., and is clearly different. The cyclic alcohol oxidation activity of MCAD was 100 times as high as CCAD. In case a corresponding annular ketone is industrially manufactured by the oxidative fermentation of cyclic alcohol, the high enzyme activity of MCAD is a big advantage.

[0010] As an interesting fact, it became clear by MCAD of this invention for division of an optical isomer to be also possible. if an example is given -- MCAD (S, S) -(+)-2 and 3-butanediol having not oxidized at all -- receiving --R [2] and (R [3])-(-)-2 and 3-butanediol It became clear that it oxidized (Table 3). This property is used and it is racemic modification. 2 and 3-butanediol is oxidized by MCAD, and if only R bodies are changed into a corresponding ketone, only S unreacted bodies will be condensed. After that, it is condensed by the usual purification method. (S, S) -(+)-2 and 3-butanediol When it refines, there is an advantage that separation of an optical isomer becomes easy.

[0011] In manufacture of the compound by bacterial coupling, a problem may arise in that the induction period of a reaction is long. In MCAD of this invention, it is proportional to both population of reaction time and the used cell, and it is what kind of time. It was shown that a reaction occurs nothing also in a lug. With the case of the great portion of oxidative fermentation, it is a time. The case where a reaction occurs without a lug is not observed. This is because substrate oxidation is performed by the outside surface of a cell. It also has the advantage referred to as that the manufacturing method using MCAD of this invention can make loss of energy small as compared with the case which must emit a production object out of a cell again after making a substrate incorporate and react to intracellular.

[0012]

[Embodiment of the Invention] The gestalt of implementation of invention is explained with reference to a drawing or a table based on an example.

[0013]

[Example 1] Screening of the production stock of MCAD followed 100 or more shares of cell strains containing other aerobic bacteria of acetic bacteria, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, and varieties. 0.03%, the presentations of the culture medium for screening are glycerol, 0.01% glucose, and 0.1% poly peptone, and cultivated among 48 hours or more and under aeration conditions under 0.2% of existence of cyclopentanol or 0.2% of cyclohexanol. In addition, all culture temperature was 30 degrees C.

[0014] The large majority of the strain separated in Thailand was well grown, whichever it used [of cyclopentanol and a cyclohexanol] as cyclic alcohol. However, the cyclohexanol said that toxicity was higher than cyclopentanol, or was considered to be bacteriostasis-like rather. Institute For Fermentation (IFO) -- or -- Although the great portion of strain which came to hand from American Type Culture Collection (ATCC) needed 48 hours or the long culture time amount beyond it, judging from the turbidity of culture medium, many of strain separated in Thailand has reached equivalent turbidity by culture of 24 hours, and it was shown that the resistance over a cyclohexanol or cyclopentanol is high.

[0015] As the example of representation out of 100 or more shares of strain examined as a result of judging with the turbidity of the culture medium after 24-hour culture *Gluconobacter frateurii* CHM 9, *Pseudomonas* sp. CHM 32, *Acetobacter rancens* SKU 1111, and *Acinetobacter calcoaceticus* LMD79.41 Four shares were selected. The comparison of enzyme activity (Enzyme activity) to the relative growth rate (Growth) of such strain, the last pH of culture medium (Final pH), and the cyclopentanol of a cell membrane fraction was shown in Table 1.

[0016]

[Table 1]

Strain	Growth ^a	Final pH ^b	Enzyme activity ^c (U/ml)
<i>Gluconobacter frateurii</i> CHM 9	++	5.0	0.51
<i>Psuedmonas</i> sp. CHM 32	+++	8.4	ND ^d
<i>Acetobacter rancens</i> SKU 1111	+	6.5	ND ^d
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> LMD 79.41	++	8.5	ND ^d

^aGrowth of bacteria strains : + corresponded to OD660 nm of 0.30-0.50 ; ++ corresponded to OD660 nm of 0.51-1.00 ; +++ corresponded to OD660 nm of over 1.00.

^bpH of culture broth was measured at 48 hr incubation.

^cEnzyme activity was measured by PMS-DCIP method at pH 5.0 .

^dND : not detected

[0017] It is related with the last pH of culture medium, and is *Gluconobacter frateurii* CHM 9. The acid value was shown. On the other hand, it is *Psuedmonas* sp. CHM 32. *Acinetobacter calcoaceticus* LMD 79.41 It was a weak alkaline value. Moreover, *Acetobacter rancens* SKU 1111 The case was the same as the value of the first pH.

[0018] the cyclopentanol dehydrogenase activity of the appearance of a cell membrane fraction -- phenazine methosulfate (PMS) -- and -- It measured by the PMS-DCIP method using 2 and 6-dichlorophenol indophenol (DCIP). As a substrate, it is 25micromol. Cyclopentanol was used. As a solution for measurement, it is McIlvaine. The buffer (pH5.0) was used. It sets under a reaction condition and one unit of enzyme activity is 1micromol in 1 minute. The definition was given as activity which carries out the catalyst of the substrate oxidation. It is *Gluconobacter frateurii* CHM 9 as a result of measurement. Activity was observed in two pH fields by the case. One is a major activity peak and another minor activity peak existed in pH5.0 at pH9.0. On the other hand, cyclopentanol dehydrogenase activity was not observed by the cell membrane fraction of other three strain.

[0019] *Psuedmonas* sp. CHM 32 It reaches. *Acinetobacter calcoaceticus* LMD 79.41 It is known by the case that the CCAD activity of the NAD dependency which exists in cytoplasm is superior. Moreover, it is known that CCAD will perform two reactions of reduction to the oxidation to the cyclopentanone of cyclopentanol and the cyclopentanol of cyclopentanone by the reaction condition. Then, cyclopentanol oxidation activity is 100micromol. The enzyme was added in the 1ml solution which consists of cyclopentanol, 50micromol glycine-NaOH (pH9.5), and 0.1micromol NAD, and the increment rate of NADH in 25 degrees C was recorded with the absorbance of 340nm. It sets under a reaction condition and one unit of enzyme activity is 1micromol in 1 minute. The definition was given as activity which produces NADH. It is *Psuedmonas* sp. CHM 32 as a result of measurement. A case is considered that cyclopentanol was consumed with cytoplasm. Moreover, *Acetobacter rancens* SKU 1111 A case seems to have survived, after thinking that the growth under cyclopentanol existence is difficult and using the cyclopentanol of a minute amount. Next, it is related with the reduction activity of cyclopentanone and is 100micromol. The enzyme was added in the 1ml solution which consists of cyclopentanone, 50micromol potassium phosphate (pH6.0), and 0.1micromol NADH, and the reduction rate of NADH in 25 degrees C was recorded with the absorbance of 340nm. It sets under a reaction condition and one unit of enzyme activity is 1micromol in 1 minute. The definition was given as activity which decreases NADH. Furthermore, the amount of enzyme generation was measured with the bottom of various culture conditions. Consequently, *Acetobacter rancens* SKU 1111 It became clear that an enzyme was a configuration-enzyme.

[0020] *Gluconobacter frateurii* CHM 9 The cell of a resting phase reacted with cyclopentanol. Then, reaction mixture was analyzed in order that the cyclopentanone which is a direct oxidation product might investigate whether it is accumulated between reactions. Pure cyclopentanone is 2 and 4-dinitrophenylhydrazine. Since it is known that it will react and a derivative can be generated, it is 2 and 4-dinitrophenylhydrazine about a reaction mixture. After making it react Thin-layer chromatography (TLC) analyzed., The reaction generated. 2 and 4-dinitrophenylhydrazone A derivative is pure cyclopentanone. 2 and 4-dinitrophenylhydrazone It is the same Rf value as a derivative. The value 0.82 was shown. Therefore, the oxidation to the cyclopentanone of cyclopentanol is proportional to both reaction time and the used number of cells as expected, and it is what kind of time. It was shown that a reaction occurs nothing also in a lug. With the case of the great portion of oxidative fermentation, it is a time. The case where a reaction occurs without a lug is not observed. This is because substrate oxidation is performed by the outside surface of a cell in the cell of this invention. Therefore, MCAD of this invention is the kino protein of the conventional CCAD or an acetic-bacteria cell membrane. Alcoholic dehydrogenase (ADH) is the result of showing that it is a clearly different new enzyme.

[0021]

[Example 2] By processing the cell membrane fraction which has the new enzyme MCAD by EDTA, it investigated whether it would have a certain effect on the oxidation activity of cyclopentanol. The method of preparation of a cell membrane fraction and a cytoplasm fraction is as follows. *Gluconobacter frateurii* CHM 9 The cells after culture are collected and they are per 10 mM Tris-HCl (pH7.5) buffer 10ml and *****. Cell suspension was prepared so that it might be set to about 10g. It is cell suspension at the pressure of 1,000psi Rannie high pressure laboratory homogenizer. It let it pass. After the usual low-speed centrifugal one removed the cell which is not crushed, centrifugal [of the obtained crude cell free extract] was further carried out for 90 minutes by 68,000xg, and the cell membrane fraction which precipitated was separated. Moreover, cell digestive liquor was used as the cytoplasm fraction. The cell membrane fraction was re-suspended in 10 mM Tris-HCl (pH7.5) buffer, and after washing by homogenizing precipitate, the at-long-intervals alignment of it was carried out by 68,000xg for 90 minutes. This washing actuation was repeated twice and mixing of a cytoplasm fraction was lessened as much as possible. MCAD activity increased to the obtained cell membrane fraction (Native membrane) by adding PQQ and CaCl₂ (drawing 1). From this result, it was shown at the time of preparation of a cell membrane fraction that MCAD exists as an apoenzyme partially.

[0022] EDTA treatment is 10mg/ml by 10 mM Tris-HCl (pH7.5) buffer. After preparing cell membrane suspension so that it may become protein, the incubation was performed for 30 minutes in the ice bath to the bottom of the condition of 20mM EDTA. After performing ultracentrifuge for 60 minutes by 90,000xg and removing supernatant liquid, precipitate was re-suspended in 10 mM Tris-HCl (pH7.5) buffer, ultracentrifuge was performed to the bottom of the same condition, and EDTA was removed. In the cell membrane after EDTA treatment, slight MCAD activity was only shown and it became clear that a great portion of MCAD was an apoenzyme (data of EDTA treated membrane of drawing 1). When activity measurement was again performed to the cell membrane fraction (EDTA-treated membrane) which has an apoenzyme after adding CaCl₂ of PQQ of 5microM, and 5mM(s) and carrying out the incubation of the 25 degrees C for 30 minutes, recovery of enzyme activity was seen.

[0023] the apoenzyme of a cell membrane fraction -- receiving -- PQQ 5microM or -- CaCl₂ 25mM As for the effectiveness, CaCl₂ was larger, although both recovery of enzyme activity was seen when activity measurement was performed again after adding independently and carrying out the incubation of the 25 degrees C for 30 minutes (drawing 1). From this result, it is surmised that the principal action of EDTA is having removed calcium²⁺ ion from the enzyme according to the chelation effectiveness. Therefore, the apoenzyme was changed into the holoenzyme and it was shown by by adding both PQQ and CaCl₂ that MCAD activity is recoverable to the original level. Therefore, MCAD of this invention reached the conclusion that it was typical kino protein (quinoprotein) cyclic alcohol dehydrogenase.

[0024]

[Example 3] Judgment solubilization of MCAD was performed from the cell membrane fraction. Solubilization of an enzyme is preceded and it is each to cell membrane suspension. PQQ 5microM CaCl₂ 25mM It added and the apoenzyme was made into the holoenzyme. All the protein of the cell membrane fraction used for solubilization was 1.4g, and cyclopentanol dehydrogenase activity was 3,120 units (black bar of Membrane on the left-hand side of drawing 2). Moreover, kino protein ADH activity was 1,440 units (bar of the void of Membrane on the left-hand side of drawing 2). Na-cholate after 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) buffer adjusts [ml] the protein concentration of a cell membrane fraction in 10mg /It added so that it might become 0.5%, and it stirred slowly for 1 hour. When it performed centrifugal [for 60 minutes] by 68,000xg, the great portion of kino protein ADH activity moved to centrifugal supernatant liquid (Supernatant). However, 70% or more of original cyclopentanol dehydrogenase activity remained in the cell membrane fraction (Precipitate) which precipitated (data of Na-cholate of drawing 2).

[0025] 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) buffer was made to suspend the cell membrane fraction which precipitated, and protein concentration was adjusted [ml] in 10mg /. To the suspension of this cell membrane fraction, it is Mydol 10TM. It added so that it might become 1.0%, and it stirred gently for further 1 hour. When it performed centrifugal [for 60 minutes] by 68,000xg, about 1/3 of the cyclopentanol dehydrogenase activity in the original cell membrane fraction appeared in centrifugal supernatant liquid (black bar of Mydol 10TM on the right-hand side of drawing 2). On the other hand, kino protein ADH activity was so low that it was undetectable in the usual activity test condition. It is shown that it is not what MCAD activity depends on the kino protein ADH, and it was shown for the first time by these results that the enzyme MCAD which oxidizes cyclic alcohol specifically exists in the cell membrane fraction of acetic bacteria.

[0026]

[Example 4] Next, MCAD was refined. It is with 5mM CaCl₂ about the MCAD solution gradually solubilized as the example 3 described. 10mM(s) containing Mydol 10TM 0.3% It applied to DEAE-Toyo Perl Callum (2.6x9cm) who

made it equilibrate by the acetic-acid buffer (pH5.0). MCAD was not adsorbed but some impurities were removed by this actuation. The solutions which passed the column are collected and it is with 5mM CaCl₂. 10mM(s) containing Mydol 10TM 0.3% It dialyzed by the acetic-acid buffer (pH4.0).

[0027] Next, about the solution after dialysis, it is with 5mM CaCl₂. 10mM(s) containing Mydol 10TM 0.3% The column was adsorbed in the place applied to CM-Toyo Perl Callum (1.6x6cm) who equilibrated by the acetic-acid buffer (pH4.0), and the kino protein ADH which MCAD(ed) and remained. 10mM(s) containing 5mM CaCl₂ After washing by the acetic-acid buffer (pH4.0), CaCl₂ linear density gradient of 5-40mM performed elution. As shown in drawing 3, the peak (- mark of drawing 5) which has MCAD activity in the peak fraction detected with the absorbance (O mark of drawing 5) of 280nm was detectable. As a result of collecting the peak fractions which have MCAD activity and SDS-PAGE's analyzing, it became clear that it was the single peak of molecular weight 83kDa (lane 2 of drawing 4). In addition, the lane 1 of drawing 4 is the band of a size marker, and phosphorylase b (94kDa), bovine serum albumin (68 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonicanhydrase (31 kDa), and lysozyme (14.4 kDa) were used for it.

[0028] Moreover, the back peak was an elution peak of the kino protein ADH between two peaks detected with the absorbance (** mark of drawing 5) of 420nm. MCAD was completely separated with the kino protein ADH, and it was also proved by coincidence that both are not the same objects. MCAD was refined 25 times by two steps of such purification actuation (Table 2).

[0029]

[Table 2]

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Membrane	850	1,520	1.8	1.0	100
Solubilization	37	647	17.5	9.7	43
DEAE-Toyopearl	18	280	15.5	8.6	18
CM- Toyopearl	4.8	213	44.3	25.0	14

[0030]

[Example 5] The substrate specificity of MCAD was investigated about both the cell membrane fraction and the purification enzyme (Table 3).

[0031]

[Table 3]

Substrate	Relative activity (%)		
	Membrane ^a (MCAD)	Purified enzyme ^b (MCAD)	Cytoplasmic enzyme ^c (CCAD)
cyclopentanol	100	100	100
cyclohexanol	34	73	179
cyclobutanol	54	73	61
cyclooctanol	83	137	ND ^d
tetrahydrofuryl alcohol	25	0	0
hydroxyproline	2	0	0
furfuryl alcohol	75	4	0
cis-4-cyclopenten-1,3-diol	668	32	0
1,3- cyclopentanediol	58	73	363
cis-1,2- cyclopentanediol	116	181	ND ^d
(1R,2R)-trans-1,2-cyclohexanediol	48	74	5
(1S,2S)-trans-1,2-cyclohexanediol	13	11	0
1,4-cyclohexanediol	19	14	0
cis-1,2- cyclohexanediol	33	88	12
1,2-butanediol	94	63	115
1,3-butanediol	62	12	6
1,4-butanediol	41	0	0
2,3-butanediol	118	186	0
(S,S)-(+)-2,3- butanediol	5	0	0
(2R,3R)-(-)-2,3- butanediol	41	41	51
2,4-pentanediol	62	16	30
2-methyl-2,4- pentanediol	50	17	23
methanol	0	0	0
ethanol	69	0	0
1-propanol	38	0	5
1-butanol	69	1	ND ^d
2-propanol	75	17	31
2-butanol	109	41	424
2-hexanol	12	10	70
3-pentanol	75	74	57
cyclopentanone	0	0	11
cyclohexanone	0	0	763
acetone	0	0	12
acetaldehyde	140	5	0
glycerol	66	59	0
D,L-threitol	4	2	0
meso-erythritol	77	100	0
xylitol	2	0	0
ribitol	41	34	0
D-arabitol	54	78	0
L- arabitol	7	0	0
dulcitol	2	0	0
D-sorbitol	48	34	0
D-mannitol	18	25	10
myo-inositol	5	0	0
D-gluconate	21	7	0
2-keto-gluconate	0	0	0

^aMCAD was measured with the membrane fraction of the organism

^bPurified MCAD from the membrane.

^cPurified CCAD from the cytoplasm. , ^dND : not determined

[0032] MCAD was specific to altitude to cyclic alcohol especially cyclopentanol, and a cyclohexanol. As a result of examining under optimum conditions, the Michaelis constant of the appearance to cyclopentanol was measured as it is 1mM. By MCAD, it is cyclooctanol, cis-1, and 2-cyclopentanediol. It reaches. It was an interesting result that 2 and 3-butanediol oxidizes well. Moreover, as for MCAD, some the 2nd class alcohol of aliphatic series also oxidized. It adds to oxidation of cyclic alcohol or the 2nd class alcohol, and MCAD is glycerol, meso-erythritol, ribitol, D-arabitol, and D-sorbitol. It reaches. D-mannitol Sugar-alcohol [like] also oxidized. MCAD is considered to recognize these sugar-alcohol as the 2nd class alcohol.

[0033] Each oxidation product as well as the case of cyclopentanone was accumulated out of the cell. Therefore, MCAD is a chiral. It is considered the useful enzyme in chemistry. That MCAD is carrying out localization to the

outside surface of a cell membrane has the advantage of making oxidative fermentation of cyclic alcohol easy. Since the mechanism of oxidative fermentation has some biological toxicity to the viable cell owing to, the cyclic alcohol of oxidizing by incorporating such a toxic substance to intracytoplasmic is not desirable. Moreover, excessive bioenergy is required in order to pump out an oxidation product out of a cell through a cell membrane. As a coenzyme, only PQQ was effective and NAD (P) and NAD(P) H, and FAD and FMN were not effective as a coenzyme.

[0034]

[Example 6] Gluconobacter frateurii CHM 9 CCAD of the NAD dependency which exists in cytoplasm proved that MCAD of this invention was a different enzyme. DEAE cellulose which equilibrated the cytoplasm fraction mentioned above by Buffer A (2mM KPB pH7.2 containing 5 mM beta-mercaptoethanol) It applied to the column (2.5x20cm). Elution of the CCAD was carried out by the buffer A which contains 0.2M KCl after washing a column by Buffer A. Blue equilibrated by Buffer A after carrying out overnight dialysis of the collected CCAD fraction to Buffer A Dextran Sepharose It applied to the column (2x20cm). CCAD is blue. Dextran Although a sepharose column was not adsorbed, the enzyme of an NAD (P) dependency was removed at this step.

[0035] Next, DEAE-sephadex equilibrated by Buffer A A-50 It applied to the column (1.5x20cm). It was eluted in the buffer A which contains 100mM KCl after washing a column by the buffer A containing 75mM KCl, and was eluted in the buffer A which contains 125mM KCl next. Elution of the principal part of CCAD was carried out by the buffer A containing 125mM KCl. Hydroxyapatite equilibrated by Buffer A in the collected CCAD fraction It applied to the column (5x7cm). 15mMphosphate(s) After washing and CCAD are 30mM phosphate at the included buffer A. Elution was carried out by the included buffer A. Finally, it is ammonium sulphate. CCAD was crystallized (drawing 5).

[0036] The outline of CCAD purification was shown in Table 4. CCAD was refined 38 times from the crude extract, and was obtained with 28% of recovery of total yield. Hitachi Analytical ultracentrifuge SCP85H As a result of using and measuring the sedimentation pattern of CCAD every 10 minutes under the condition of 20 degrees C and 60,000 rpm, an apparent settling velocity is the symmetry peak which is 3.0s, and, as for the word, it was shown roughly that the molecular weight of CCAD is equivalent to 60kDa(s) ((A) of drawing 6). From the result of SDS-PAGE, it was shown clearly that it consisted of two same subunits of molecular weight 29,000 ((B) of drawing 6).

[0037]

[Table 4]

Step	Total protein (mg)	Total activity* (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell-free extract	10,100	123	0.012	1	100
DEAE-cellulose	2,850	108	0.038	3	88
Sephadex A-50	1,681	97	0.056	5	79
Hydroxyapatite	190	76	0.400	33	62
Crystallization	74	34	0.460	38	28

*Cyclopentanol oxidation in the presence of NAD was measured.

[0038] In addition, after purification according [a lane 3] to a DEAE-cellulose (15microg protein) and a lane 4 according [the lane 2 of drawing 6] to a cell-free extract (20microg protein) are DEAE-sephadex. A lane 6 is a result after the first crystallization (5microg protein) after purification according [a lane 5] to hydroxyapatite (5microg protein) after the purification by A-50 (10microg protein). Moreover, a lane 1 is the band of a size marker and used phosphorylase b (110 kDa), bovine serum albumin (77 kDa), ovalbumin (50.5 kDa), carbonic anhydrase (35.2 kDa), soybean trypsin inhibitor (29.1 kDa), and lysozyme (14.4 kDa).

[0039]

[Example 7] The substrate specificity of CCAD was shown in Table 3. CCAD is 50mM. When it examined in glycine-NaOH, cyclic alcohol was oxidized under alkaline pH condition of 8.5-10.0. Although CCAD oxidized cyclic alcohol, about the substrate specificity in oxidation of cyclic alcohol, it was narrower than MCAD (Table 3). Since CCAD oxidizes 2-butanol (2-butanol) well, it is considered to be dehydrogenase of the 2nd class alcohol. Crystallized CCAD receives cyclopentanol. 0.45 units/mg protein Although the specific activity to say was shown, as compared with the specific activity (44.3 units/mg protein) over the cyclopentanol of MCAD of a film joint mold, about 100 times were also a low value.

[0040] It is thought that the intracytoplasmic NAD(P) dependency enzyme which has a low Michaelis constant is

reflecting the exclusion system with the toxic rapid compound generated in cytoplasm by chance. Of course, the cyclopentanol or the cyclohexanol which were used for this invention do not exist naturally by high concentration. Therefore, it should be thought that cyclopentanol and a cyclohexanol are the truth and the actual substrates of CCAD.

[0041] The Michaelis constant of the appearance of CCAD to a cyclohexanol and NAD was measured with 7mM(s) and 73microM, respectively. Moreover, cyclohexanone (cyclohexanone) And the Michaelis constant of the appearance of CCAD to NADH was measured with 18mM(s) and 0.4mM(s), respectively.

[0042] On the other hand, reduction of the annular ketone by CCAD is 50mM. When it examined in sodium acetate, the highest activity was shown under the acid conditions of pH5.0. Thus, CCAD has high reactivity to the cyclohexanone and was returned easily to the cyclohexanol which is corresponding cyclic alcohol. From the above result, it was proved that MCAD of this invention and the conventional CCAD are completely different enzymes.

[0043] When the cell of a resting phase or a cell membrane fraction, and the cyclic alcohol of a substrate were mixed, cyclic alcohol was changed into the corresponding annular ketone for a short time. The conversion rate was so big that it could not be measured with the reaction rate by CCAD of an NAD dependency. Therefore, it is shown that CCAD does not have any contributions to oxidative fermentation, and it was able to be shown clearly that only MCAD of a film joint mold is functioning.

[0044]

[Effect of the Invention] this invention persons pointed out to the cell membrane of an aerobic bacterium existence of the oxidation activity which uses PQQ as a coenzyme for the first time, and screened the cyclic alcohol dehydrogenase production stock of a film joint mold to it for 100 or more shares of cell strains containing aerobic bacteria, such as acetic bacteria. Consequently, the film joint mold cyclic alcohol dehydrogenase (MCAD) which has the activity with the conventional CCAD high [100 times] which exists in the cell membrane of the acetic bacteria of Gluconobacter was found out, and it solubilized and refined for the first time.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Film joint mold cyclic alcohol dehydrogenase of acetic bacteria and other aerobic Gram negative bacterium.

[Claim 2] Film joint mold cyclic alcohol dehydrogenase according to claim 1 whose acetic bacteria are the acetic bacteria of *Gluconobacter*.

[Claim 3] acetic bacteria of *Gluconobacter* *Gluconobacter frateurii* CHM 9 it is -- film joint mold cyclic alcohol dehydrogenase according to claim 1 or 2.

[Claim 4] Film joint mold cyclic alcohol dehydrogenase given in either of claims 1-3 which uses PQQ as a coenzyme and needs calcium²⁺ ion for the manifestation of activity.

[Claim 5] The manufacturing method of the annular ketone from cyclic alcohol using film joint mold cyclic alcohol dehydrogenase given in either of claims 1-4.

[Claim 6] The manufacturing method of the 2nd class ketone from the 2nd class alcohol using film joint mold cyclic alcohol dehydrogenase given in either of claims 1-4.

[Claim 7] The manufacturing method according to claim 5 or 6 using the cell membrane fraction or cell which has film joint mold cyclic alcohol dehydrogenase.

[Claim 8] The separation method of an optical isomer characterized by separating only the optical isomer which only one optical isomer of a racemic compound oxidized and did not oxidize using film joint mold cyclic alcohol dehydrogenase.

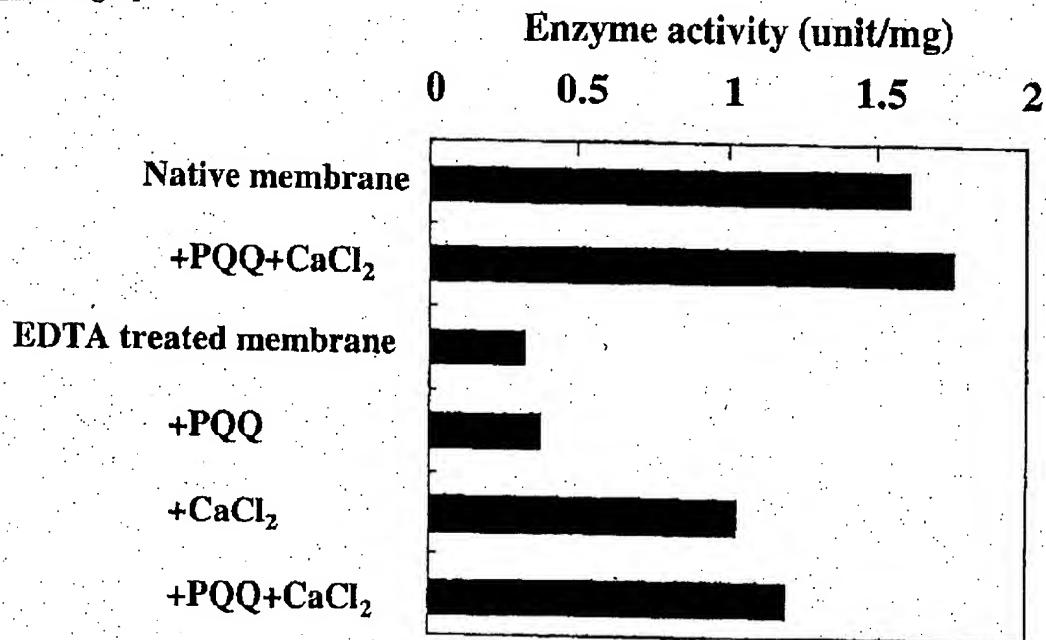
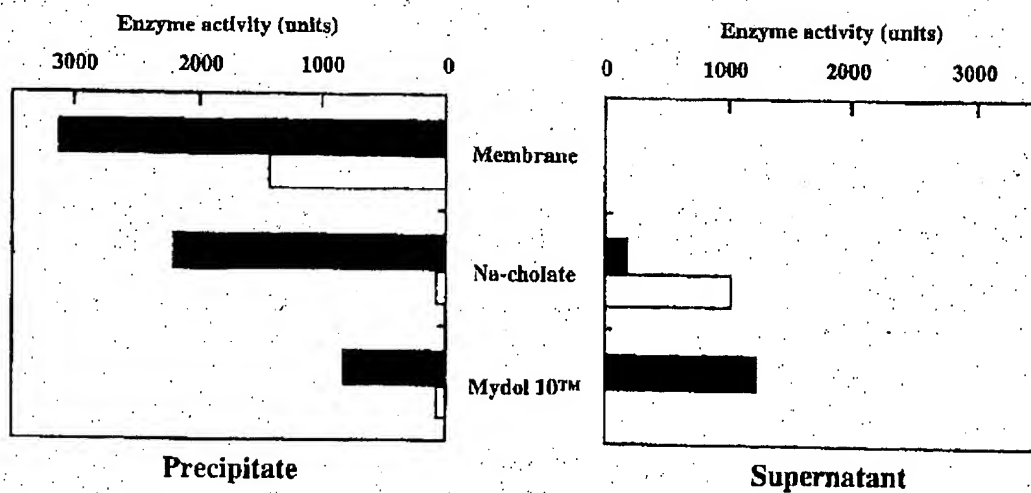
[Claim 9] film joint mold cyclic alcohol dehydrogenase *Gluconobacter frateurii* CHM 9 the enzyme of the origin -- it is -- racemic compound 2 and 3-butanediol it is -- separation method of an optical isomer according to claim 8.

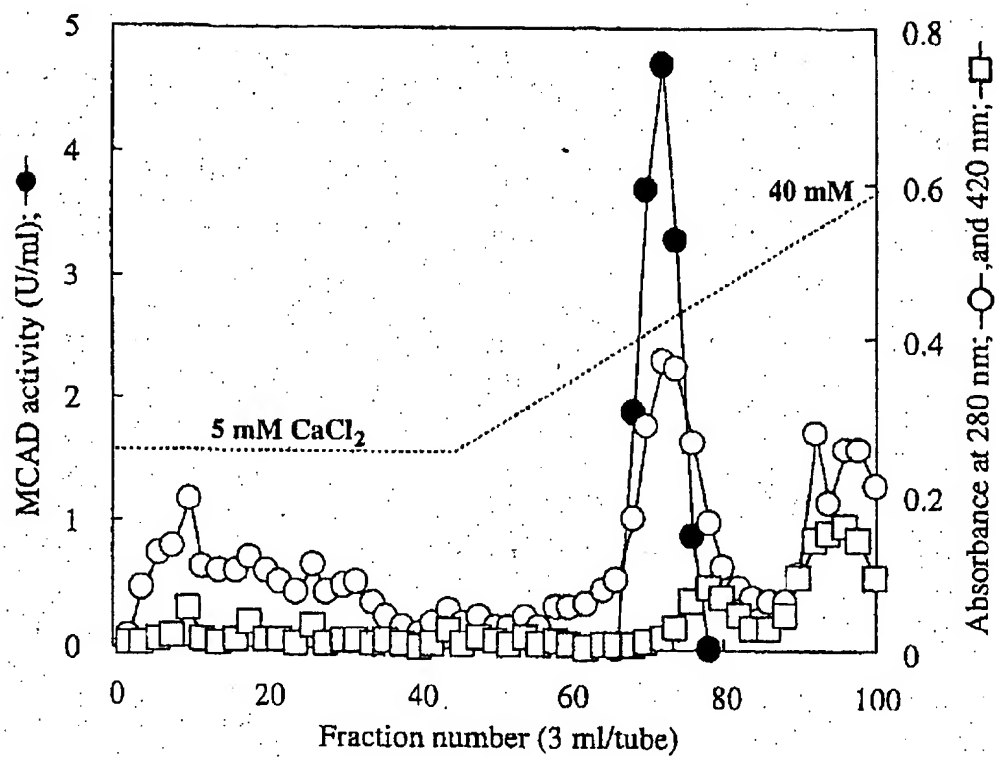
[Translation done.]

*** NOTICES ***

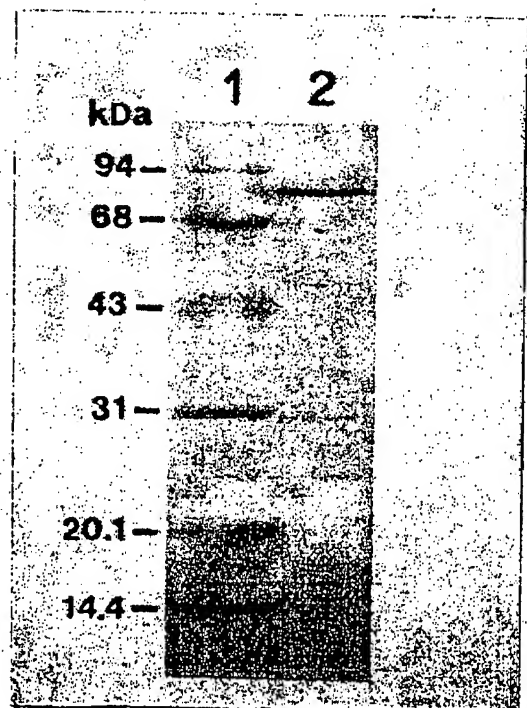
JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS**[Drawing 1]****[Drawing 2]****[Drawing 3]**

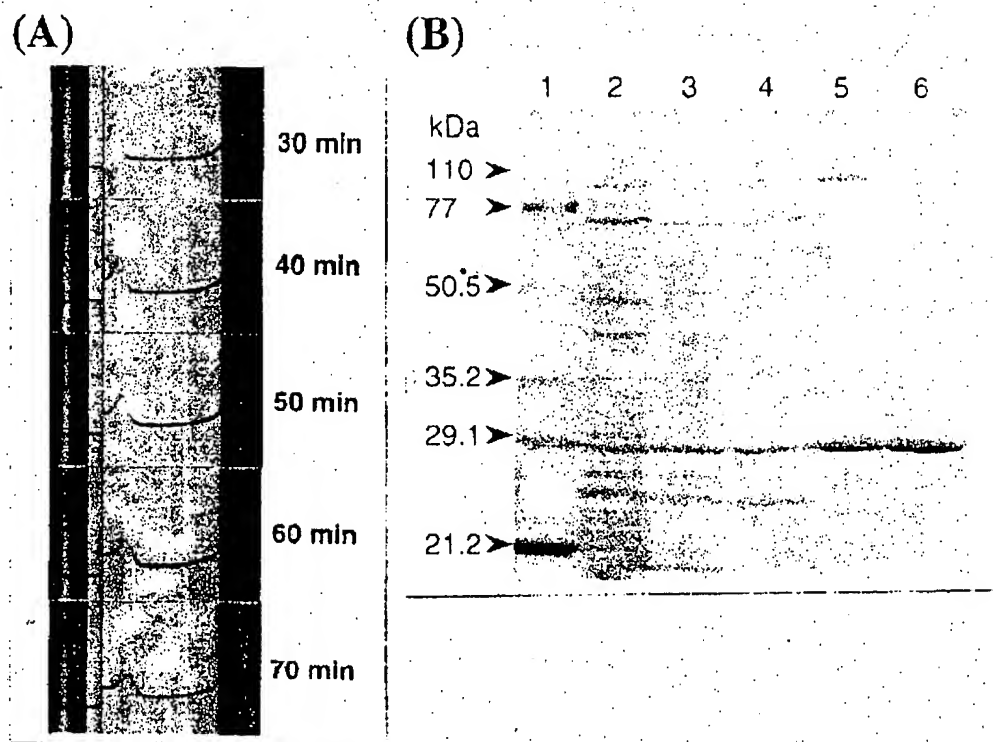


[Drawing 4]



[Drawing 5]

[Drawing 6]



[Translation done.]

(N)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-180343

(P2003-180343A)

(43) 公開日 平成15年7月2日 (2003.7.2)

(51) IntCl. ⁷	識別記号	F I	デマコード* (参考)
C 1 2 N 9/04		C 1 2 N 9/04	E 4 B 0 5 0
C 1 2 P 7/26		C 1 2 P 7/26	4 B 0 6 4
41/00		41/00	C

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2001-384688 (P2001-384688)

(22) 出願日 平成13年12月18日 (2001. 12. 18)

(71) 出願人 800000013

有限会社山口ティー・エル・オー

山口県宇部市東梶返1丁目10番8号 常盤
工業会館内

(72) 発明者 足立 収生

山口県山口市大字吉田1677番1号 山口大
学農学部

(72) 発明者 松下 一信

山口県山口市大字吉田1677番1号 山口大
学農学部

(74) 代理人 100080539

弁理士 高木 義輝

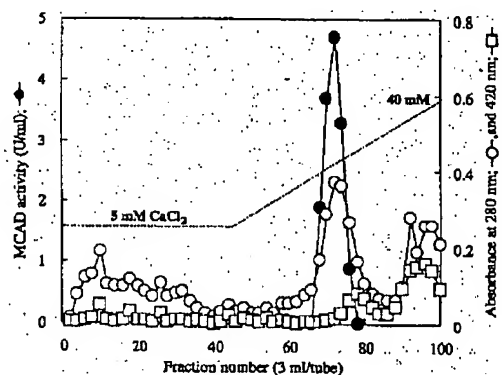
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膜結合型環状アルコール脱水素酵素

(57) 【要約】

【課題】 酢酸菌、特にグルコノバクター属の酢酸菌の細胞膜に存在する、PQQを補酵素とする膜結合型の環状アルコール脱水素酵素 (MCAD) が、既知のキノプロテインADHやNAD依存性のCCADとは異なる酵素であって、環状アルコールや2級アルコール等の酸化生成物の製造に適していることを明らかにすることが課題である。

【解決手段】 本発明者らは、好気性細菌の細胞膜に、PQQを補酵素とする酸化活性の存在を初めて指摘し、酢酸菌等の好気性細菌を含む100株以上の細胞株を対象として、MCAD産生株のスクリーニングを行った。その結果、グルコノバクター属の酢酸菌の細胞膜に存在する、高いMCAD活性を有する菌株を見出し、MCADを初めて可溶化・精製して、その性質を明らかにした。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 酢酸菌及び他の好気性グラム陰性細菌の膜結合型環状アルコール脱水素酵素。

【請求項2】 酢酸菌がグルコノバクター属の酢酸菌である、請求項1に記載の膜結合型環状アルコール脱水素酵素。

【請求項3】 グルコノバクター属の酢酸菌が *Gluconobacter frateurii* CHM 9 である、請求項1または2に記載の膜結合型環状アルコール脱水素酵素。

【請求項4】 PQQを補酵素とし、活性の発現にCa²⁺イオンを必要とする、請求項1から3のいずれかに記載の膜結合型環状アルコール脱水素酵素。

【請求項5】 請求項1から4のいずれかに記載の膜結合型環状アルコール脱水素酵素を用いる、環状アルコールからの環状ケトンの製造法。

【請求項6】 請求項1から4のいずれかに記載の膜結合型環状アルコール脱水素酵素を用いる、2級アルコールからの2級ケトンの製造法。

【請求項7】 膜結合型環状アルコール脱水素酵素を有する細胞膜画分または細胞を用いる、請求項5または6に記載の製造法。

【請求項8】 膜結合型環状アルコール脱水素酵素を用いて、ラセミ化合物の一方の光学異性体だけを酸化し、酸化されなかった光学異性体だけを分離することを特徴とする、光学異性体の分離法。

【請求項9】 膜結合型環状アルコール脱水素酵素が *Gluconobacter frateurii* CHM 9 由来の酵素であって、ラセミ化合物が 2,3-butanediol である、請求項8に記載の光学異性体の分離法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 酢酸菌、特にグルコノバクター属の酢酸菌の細胞膜に存在する、PQQを補酵素とする膜結合型環状アルコール脱水素酵素(MCAD)に関する。

【0002】

【従来の技術】 酢酸菌やその他 *Psuedomonas* 属菌などの細胞質には、NAD依存性の細胞質型環状アルコール脱水素酵素(CCAD)の存在が知られているが、CCADの環状アルコール脱水素酵素活性は非常に低い。また、グルコノバクター属の酢酸菌の細胞質に存在するCCADも環状アルコール脱水素酵素活性を有しているが、本発明の pyrroloquinoline quinone (PQQ)を補酵素とする膜結合型環状アルコール脱水素酵素(MCAD)と比較すると、100倍も低い活性に過ぎなかった。従って、環状アルコールの酸化生成物を工業的に製造するための酸化発酵プロセスに、キノプロテインアルコール脱水素酵素(ADH)やCCADを用いるのは生産効率の点で問題がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 酢酸菌、特にグルコノバクター属の酢酸菌の細胞膜に存在する、PQQを補酵素とするMCADが、従来のADHやCCADとは異なる酵素であって、環状アルコールや2級アルコール等の酸化生成物の製造に適していることを明らかにすることが課題である。

【0004】

【課題を解決するための手段】 環状アルコールの微生物による酸化や酵素による酸化に関する多数の研究が、種々のバクテリアを用いて行われてきた。それらの大部分は、シュードモナス(*Psuedomonas*)やアシネトバクター(*Acinetobacter*)由来のNAD依存性シクロヘキサノール脱水素酵素(EC 1.1.1.245)に関連している。また、シクロヘキサノール酸化は、シクロヘキサン代謝の過程において研究されてきた。シクロヘキサノール酸化のための遺伝子群の遺伝子解析は、アシネトバクターにおいて研究された。

【0005】 NAD依存性シクロヘキサノール脱水素酵素によるシクロヘキサンのシクロヘキサノールへの還元は、水素化酵素とのカップリングによってシクロヘキサノールを産生することが提案されている。これは、環状ケトン還元酵素または環状アルデヒド還元酵素と同様なケースである。初期の研究において、イソプロパノールを産生するNADPH依存性アセトン還元酵素が報告された。哺乳類においても、同様のケトン還元酵素が報告されている。カルボニル化合物の非対称還元を触媒する多数のアルドーケトン還元酵素は、光学活性化合物の合成に有用なことが証明された。

【0006】 微生物によるシクロペンタノール酸化もまた、シュードモナスに関して研究されており、NAD依存性脱水素酵素(EC 1.1.1.163)は、環状アルコールの酸化的分解の最初のステップにおいて作用している酵素であることが示されている。シクロヘキサノール酸化はまた、シュードモナス由来の2級アルコール酸化酵素においても観察されており、過酸化水素を産生するフラビン依存性酵素が機能している。

【0007】 myo-inositol や関連する cyclitol 等の酸化を触媒する酵素もまた、多くの文献において、NAD依存性酵素として知られている。しかしながらMCADに関しては、何も報告されていないため、MCADの機能、局在部位、触媒的性質、物理化学的性質および生理的機能に関しては、何の情報も存在していない。

【0008】 本発明者らは、好気性細菌の細胞膜に、PQQを補酵素とする酸化活性の存在を初めて指摘した。そこで、酢酸菌、シュードモナス、アシネトバクターおよび多種類の他の好気性細菌を含む100株以上の細胞株を対象として、MCADの産生株のスクリーニングを行った結果、酢酸菌、特にグルコノバクター属の酢酸菌の細胞膜に存在する、PQQを補酵素とするMCADを見出し、初めて可溶化、精製を行った。

【0009】*Gluconobacter frateurii* CHM 9 のMCADの性質を、本発明のMCADの代表例として以下に述べる。MCADは、酢酸菌の細胞膜に存在する、PQQを補酵素とする環状アルコール脱水素酵素と命名されているが、広く環状アルコール類を酸化するほか、2級アルコール類も酸化する酵素であって、広い基質特異性を有している。既に知られている細胞質に存在しているCCADとは、細胞内の存在部位、基質特異性、動力学的性質等から考えて明らかに異なる、新規な酵素であることが判明した。MCADの環状アルコール酸化活性は、CCADの100倍も高かった。環状アルコール類の酸化発酵により、対応する環状ケトンを経工業的に製造する際には、MCADの高い酵素活性は大きな利点である。

【0010】興味ある事実として、本発明のMCADにより、光学異性体の分割が可能であることも明らかになった。一例を挙げると、MCADは (S,S)-(+)-2,3- butanediol を全く酸化しなかったのに対し、(2R,3R)-(-)-2,3- butanediol は酸化することが判明した(表3)。この性質を利用して、ラセミ体の 2,3- butanediolをMCADにより酸化して、R体だけを対応するケトンに変換すると、未反応のS体だけが濃縮される。その後、通常の精製法により、濃縮されている (S,S)-(+)-2,3- butanediol を精製すると、光学異性体の分離が容易になるという利点がある。

【0011】発酵法による化合物の製造においては、反応の誘導時間が長いという点で問題が生じる場合もある。本発明のMCADの場合は、反応時間および用いた細胞のポピュレーションの両方に比例して、いかなるタイムラグもなしに反応が起こることが示された。酸化発酵の大部分のケースでは、タイムラグなしに反応が起こるケースは観察されていない。これは、基質酸化が、細胞の外表面で行われているからである。基質を細胞内に取り込んで反応させた後、産生物を再び細胞外へと放出しなければならないケースと比較すると、本発明のMCADを用いる製造法は、エネルギーの損失を小さくできるという長所も有している。

* 【0012】

【発明の実施の形態】発明の実施の形態を、実施例にもとづき図面や表を参照して説明する。

【0013】

【実施例１】MCADの産生株のスクリーニングは、酢酸菌、シュドモナス、アシネトバクターおよび多種類の他の好気性細菌を含む、100株以上の細胞株について行った。スクリーニング用培地の組成は、0.03%グリセロール、0.01%グルコース、0.1%ポリペプトンであり、0.2%のシクロペンタノールまたは0.2%のシクロヘキサノールの存在下に48時間以上の間、通気条件下で培養を行った。なお、培養温度は、すべて30℃であった。

【0014】タイ国で分離された菌株の大多数は、環状アルコールとしてシクロペンタノールとシクロヘキサノールのどちらを用いても、よく生育した。ただし、シクロヘキサノールはシクロペンタノールよりも毒性が高いというか、むしろ静菌的であるように思われた。Institute For Fermentation (IFO) または American Type Culture Collection (ATCC) から入手した菌株の大部分は、培養液の濁度から判断すると、48時間かそれ以上の長い培養時間を必要としたが、タイ国で分離された菌株の多くは、24時間の培養により同等の濁度に達しており、シクロヘキサノールやシクロペンタノールに対する耐性が高いことが示された。

【0015】24時間培養後の培養液の濁度によって判断した結果、試験した100株以上の菌株の中から、代表例として *Gluconobacter frateurii* CHM 9、*Pseudomonas* sp. CHM 32、*Acetobacter rancens* SKU 1111、*Acinetobacter calcoaceticus* LMD79.41 の4株を選抜した。これらの菌株の相対生育速度 (Growth)、培養液の最終 pH (Final pH)、細胞膜画分のシクロペンタノールに対する酵素活性 (Enzyme activity) の比較を、表1に示した。

【0016】

【表1】

Strain	Growth ^a	Final pH ^b	Enzyme activity ^c (U/ml)
<i>Gluconobacter frateurii</i> CHM 9	++	5.0	0.51
<i>Pseudomonas</i> sp. CHM 32	+++	8.4	ND ^d
<i>Acetobacter rancens</i> SKU 1111	+	6.5	ND ^d
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> LMD 79.41	++	8.5	ND ^d

*Growth of bacteria strains : + corresponded to OD660 nm of 0.30-0.50 ; ++ corresponded to OD660 nm of 0.51-1.00 ; +++ corresponded to OD660 nm of over 1.00.

^bpH of culture broth was measured at 48 hr incubation.

*Enzyme activity was measured by PMS-DCIP method at pH 5.0.

^dND : not detected

【0017】培養液の最終pHに関しては、*Gluconobacter frateurii* CHM 9 だけが、酸性の値を示した。一方、*Pseudomonas* sp. CHM 32 と *Acinetobacter calcoac-*

※eticusLMD 79.41 は、弱アルカリ性の値であった。また、*Acetobacter rancens* SKU 1111 の場合は、最初の pH の値と同じであった。

【0018】細胞膜画分の見掛けのシクロペンタノール脱水素酵素活性は、phenazine methosulfate (PMS) および 2,6-dichlorophenol indophenol (DCIP) を用いる PMS-DCIP 法により測定した。基質としては、25 μmol のシクロペンタノールを用いた。測定用溶液としては、McIlvaine バッファー (pH 5.0) を用いた。酵素活性の1ユニットは、反応条件下において、1分間に1 μmol の基質酸化を触媒する活性として定義した。測定の結果、Gluconobacter frateurii CHM 9 の場合は、2つのpH領域で活性が観察された。一つはメジャーな活性ピークであってpH 5.0に、もう一つのマイナーな活性ピークはpH 9.0に存在していた。一方、その他の3つの菌株の細胞膜画分には、シクロペンタノール脱水素酵素活性は観察されなかった。

【0019】Pseudomonas sp. CHM 32 および Acinetobacter calcoaceticus LMD 79.41 の場合は、細胞質に存在するNAD依存性のCCAD活性が優勢であることが知られている。またCCADは、反応条件により、シクロペンタノールのシクロペンタノンへの酸化と、シクロペンタノンのシクロペンタノールへの還元を行うことが知られている。そこで、シクロペンタノール酸化活性は、100 μmol シクロペンタノール、50 μmol glycine-NaOH (pH 9.5)、0.1 μmol NAD から成る1mlの溶液中に酵素を添加し、340nmの吸光度により、25℃におけるNADHの増加速度を記録した。酵素活性の1ユニットは、反応条件下において、1分間に1 μmol のNADHを産生する活性として定義した。測定の結果、Pseudomonas sp. CHM 32 の場合は、シクロペンタノールは細胞質で消費されたと考えられる。また、Acetobacter rancens SKU 1111 の場合は、シクロペンタノール存在下での生育は困難と考えられ、微量のシクロペンタノールを利用した後に、生き延びていたように見える。次に、シクロペンタノンの還元活性に関しては、100 μmol シクロペンタノン、50 μmol potassium phosphate (pH 6.0)、0.1 μmol NADHから成る1mlの溶液中に酵素を添加し、340nmの吸光度により、25℃におけるNADHの減少速度を記録した。酵素活性の1ユニットは、反応条件下において、1分間に1 μmol のNADHを減少させる活性として定義した。さらに、いろいろな培養条件下に、酵素生成量を比較した。その結果、Acetobacter rancens SKU 1111 の酵素は、構成的な酵素であることが判明した。

【0020】Gluconobacter frateurii CHM 9 の休止期の細胞は、シクロペンタノールと反応した。そこで直接の酸化生成物であるシクロペンタノンが、反応の間に蓄積されているか否かを調べるため、反応液を分析した。純粋なシクロペンタノンは、2,4-dinitrophenylhydrazine と反応して誘導体を生成し得ることが知られているので、反応混合物を2,4-dinitrophenylhydrazine と反

応させた後、薄層クロマトグラフィー (TLC) により分析した。反応により生成した 2,4-dinitrophenylhydrazine 誘導体は、純粋なシクロペンタノンの 2,4-dinitrophenylhydrazine 誘導体と同じRf値である 0.82 という値を示した。従って、予期した通りに、シクロペンタノールのシクロペンタノンへの酸化は、反応時間および用いた細胞数の両方に比例して、いかなるタイムラグもなしに反応が起こることが示された。酸化発酵の大部分のケースでは、タイムラグなしに反応が起こるケースは観察されていない。これは、本発明の細胞では、基質酸化が細胞の外表面で行われるからである。従って、本発明のMCADが、従来のCCADや酢酸菌細胞膜のキノプロテイン アルコール脱水素酵素 (ADH) とは、明らかに異なる新規な酵素であることを示す結果である。

【0021】

【実施例2】新規酵素MCADを有する細胞膜画分をEDTAで処理することにより、シクロペンタノールの酸化活性に何らかの影響を及ぼすか否かを調べてみた。細胞膜画分と細胞質画分の調製法は、以下の通りである。Gluconobacter frateurii CHM 9 の培養後の細胞を収集し、10mM Tris-HCl (pH 7.5) バッファー10ml当たり、湿細胞 約10gとなるように細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液を、1,000psiの圧力で、Rannie high pressure laboratory homogenizer に通した。通常の低速遠心により、破碎されていない細胞を除去した後、得られた粗無細胞抽出液を68,000 $\times g$ で90分間さらに遠心して、沈殿した細胞膜画分を分離した。また、細胞上清液を細胞質画分とした。細胞膜画分は、10mM Tris-HCl (pH 7.5) バッファーに再懸濁し、沈殿をホモジナイズすることにより洗浄した後、68,000 $\times g$ で90分間遠心した。この洗浄操作を2回繰り返し、細胞質画分の混入をできるだけ少なくした。得られた細胞膜画分 (Native membrane) に、PQQおよびCaCl₂を添加することにより、MCAD活性は増加した (図1)。この結果から、細胞膜画分の調製時に、MCADは部分的にアポ酵素として存在していることが示された。

【0022】EDTA処理は、10mM Tris-HCl (pH 7.5) バッファーにより、10mg/mlタンパク質となるように細胞膜懸濁液を調製した後、20mM EDTAの条件下に氷浴中で30分間インキュベーションを行った。90,000 $\times g$ で60分間の超遠心を行って上清を除去した後、沈殿を10mM Tris-HCl (pH 7.5) バッファーに再懸濁して同一条件下に超遠心を行い、EDTAを除去した。EDTA処理後の細胞膜では、僅かなMCAD活性を示しただけであり、大部分のMCADはアポ酵素になっていることが判明した (図1の EDTA treated membrane のデータ)。アポ酵素を有する細胞膜画分 (EDTA treated memb

rane) に対して、5 μ M の PQQ および 5 mM の CaCl_2 を添加し、25°C、30 分間インキュベーションした後に再び活性測定を行ったところ、酵素活性の回復が見られた。

【0023】細胞膜画分のアポ酵素に対して、PQQ 5 μ M または CaCl_2 5 mM を単独で添加し、25°C、30 分間インキュベーションした後に、再び活性測定を行ったところ、ともに酵素活性の回復は見られたが、その効果は CaCl_2 の方が大きかった（図1）。この結果から、EDTAの主作用は、キレート化効果により酵素から Ca^{2+} イオンを除去していることであると推測される。従って、PQQと CaCl_2 の両方を添加することによりアポ酵素をホロ酵素に変換し、MCAD 活性を元のレベルまで回復できることが示された。従って、本発明の MCAD は、典型的なキノプロテイン (quinoprotein) 環状アルコール脱水素酵素であるという結論に達した。

【0024】

【実施例3】細胞膜画分から、MCAD の分別可溶化を行った。酵素の可溶化に先立って細胞膜懸濁液に、それぞれ PQQ 5 μ M と CaCl_2 5 mM を添加し、アポ酵素をホロ酵素にした。可溶化に用いた細胞膜画分は、全タンパク質が 1.4 g で、シクロペンタノール脱水素酵素活性は 3.120 ユニットであった（図2 左側の Membrane の黒色のバー）。また、キノプロテイン ADH 活性は 1.440 ユニットであった（図2 左側の Membrane の白抜きのバー）。10 mM Tris-HCl (pH 7.0) バッファーにより、細胞膜画分のタンパク質濃度を 10 mg/ml に調整した後、Na-cholate を 0.5% となるように添加して、1 時間ゆっくりと攪拌した。68,000 \times g で 60 分間の遠心を行うと、キノプロテイン ADH 活性の大部分は、遠心上清 (Supernatant) に移動した。しかしながら、オリジナルのシクロペンタノール脱水素酵素活性の 70% 以上は、沈殿した細胞膜画分 (Precipitate) に残存していた（図2 の Na-cholate のデータ）。

【0025】沈殿した細胞膜画分を、10 mM Tris-HCl (pH 7.0) バッファーに懸濁させ、タンパク質濃度を 10 mg/ml に調整した。この細胞膜画分の懸濁液に、Mydol 10TM を 1.0% になるように添加し、さらに 1 時間、緩やかに攪拌した。68,000 \times g で 60 分間の遠心を行うと、元の細胞膜画分におけるシクロペンタノール脱水素酵素活性の約 3 分の 1 が、遠心上清中に出現した（図2 右側の Mydol 10TM の黒色

のバー）。一方、キノプロテイン ADH 活性は、通常の活性試験条件では検出できないほどに低かった。これらの結果は、MCAD 活性がキノプロテイン ADH によるものではないことを示しており、環状アルコールを特異的に酸化する酵素 MCAD が、酢酸菌の細胞膜画分に存在することが初めて示された。

【0026】

【実施例4】次に、MCAD の精製を行った。実施例3で述べたように、段階的に可溶化した MCAD 溶液を、5 mM CaCl_2 と Mydol 10TM 0.3% を含む 10 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) で平衡化させた DEAE-イオノパールカラム (2.6 \times 9 cm) にかけた。MCAD は吸着されず、不純物の一部が、この操作により除去された。カラムを通過した溶液を回収して、5 mM CaCl_2 と Mydol 10TM 0.3% を含む 10 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) で透析した。

【0027】次に透析後の溶液を、5 mM CaCl_2 と Mydol 10TM 0.3% を含む 10 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) で平衡化した CM-イオノパールカラム (1.6 \times 6 cm) にかけた所、MCAD および残存していたキノプロテイン ADH が、カラムに吸着された。5 mM CaCl_2 を含む 10 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) で洗浄した後、5-40 mM の CaCl_2 直線濃度勾配により、溶出を行った。図3に示したように、280 nm の吸光度（図5の○印）により検出されたピーク画分に、MCAD 活性を有するピーク（図5の●印）が検出できた。MCAD 活性を有するピーク画分を回収し、SDS-PAGE により分析した結果、分子量 83 kDa の単一ピークであることが判明した（図4のレーン2）。なお、図4のレーン1は、サイズマーカーのバンドであり、phosphorylase b (94 kDa)、bovine serum albumin (68 kDa)、ovalbumin (43 kDa)、carbonic anhydrase (31 kDa)、lysozyme (14.4 kDa) を用いた。

【0028】また、420 nm の吸光度（図5の□印）により検出された2つのピークの内、後方のピークはキノプロテイン ADH の溶出ピークであった。MCAD はキノプロテイン ADH と完全に分離され、両者は同一物でないことも同時に証明された。このような2段階の精製操作により、MCAD は 25 倍に精製された（表2）。

【0029】

【表2】

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Membrane	850	1,520	1.8	1.0	100
Solubilization	37	647	17.5	9.7	43
DEAE-Toyopearl	18	280	15.5	8.6	18
CM-Toyopearl	4.8	213	44.3	25.0	14

【0030】

*【0031】

【実施例5】細胞膜画分と精製酵素の両方について、M 10 【表3】

CADの基質特異性を調べてみた（表3）。

*

Substrate	Relative activity (%)		
	Membrane ^a (MCAD)	Purified enzyme ^b (MCAD)	Cytoplasmic enzyme ^c (CCAD)
cyclopentanol	100	100	100
cyclohexanol	34	73	179
cyclobutanol	54	73	61
cyclooctanol	83	137	ND ^d
tetrahydrofuryl alcohol	25	0	0
hydroxyproline	2	0	0
furfuryl alcohol	75	4	0
cis-4-cyclopenten-1,3-diol	668	32	0
1,3-cyclopentanediol	58	73	363
cis-1,2-cyclopentanediol	116	181	ND ^d
(1R,2R)-trans-1,2-cyclohexanediol	48	74	5
(1S,2S)-trans-1,2-cyclohexanediol	13	11	0
1,4-cyclohexanediol	19	14	0
cis-1,2-cyclohexanediol	33	88	12
1,2-butanediol	94	63	115
1,3-butanediol	62	12	6
1,4-butanediol	41	0	0
2,3-butanediol	118	186	0
(S,S)-(+)-2,3-butanediol	5	0	0
(2R,3R)-(-)-2,3-butanediol	41	41	51
2,4-pentanediol	62	16	30
2-methyl-2,4-pentanediol	50	17	23
methanol	0	0	0
ethanol	69	0	0
1-propanol	38	0	5
1-butanol	69	1	ND ^d
2-propanol	75	17	31
2-butanol	109	41	424
2-hexanol	12	10	70
3-pentanol	75	74	57
cyclopentanone	0	0	11
cyclohexanone	0	0	763
acetone	0	0	12
acetaldehyde	140	5	0
glycerol	66	59	0
D,L-threitol	4	2	0
meso-erythritol	77	100	0
xylitol	2	0	0
ribitol	41	34	0
D-arabitol	54	78	0
L-arabitol	7	0	0
dulcitol	2	0	0
D-sorbitol	48	34	0
D-mannitol	18	25	10
myo-inositol	5	0	0
D-gluconate	21	7	0
2-keto-gluconate	0	0	0

^aMCAD was measured with the membrane fraction of the organism

^bPurified MCAD from the membrane.

^cPurified CCAD from the cytoplasm., ^dND: not determined

【0032】MCADは環状アルコール、特にシクロペンタノールおよびシクロヘキサノールに対して、高度に特異的であった。シクロペンタノールに対する見掛けのミハエリス定数は、最適条件下に試験した結果、1 mMであると測定された。MCADにより、cyclooctanol、cis-1,2-cyclopentanediol および 2,3-butanediol が、良く酸化されることは興味深い結果であった。またMCADは、いくつかの脂肪族2級アルコールも酸化した。MCADは、環状アルコールや2級アルコールの酸化に加えて、glycerol、meso-erythritol、ribitol、D-*

*arabitol、D-sorbitol および D-mannitol のような糖アルコールも酸化した。MCADは、これらの糖アルコールを、2級アルコールとして認識しているように思われる。

【0033】シクロペンタノンのケースと同様に、個々の酸化生成物は細胞外に蓄積された。従ってMCADは、キラルケミストリーにおける有用な酵素と考えられる。MCADが細胞膜の外表面に局在していることが、環状アルコールの酸化発酵を容易にするという利点を有している。環状アルコールは、酸化発酵のメカニズ

ムが原因で、生細胞に対していくらかの生物学的な毒性を有しているため、このような毒性物質を細胞質内に取り込んで酸化をすることは好ましくない。また、酸化生成物を細胞膜を通して細胞外に汲み出すためには、余分なバイオエネルギーが必要である。補酵素としてはPQ Qだけが有効であり、NAD(P)、NAD(P)H、FADおよびFMNは、補酵素として有効ではなかった。

【0034】

【実施例6】*Gluconobacter frateurii* CHM 9 の細胞質に存在するNAD依存性のCCADは、本発明のMCADとは異なる酵素であることを証明した。前述した細胞質画分を、バッファA (5 mM β -mercaptoethanol を含む2 mM KPB pH7.2) で平衡化したDEAEセルロース カラム (2.5×20 cm) にかけた。バッファAでカラムを洗浄後、0.2 M KClを含むバッファAでCCADを溶出させた。回収したCCAD画分を、バッファAに対して一夜透析した後、バッファAで平衡化されたブルー デキストラン セファローズ カラム (2×20 cm) にかけた。CCADは、ブルー デキストラン セファローズカラムには吸着されなかったが、NAD(P) 依存性の酵素は、このステップで除去された。

【0035】次に、バッファAで平衡化されたDEAEセファデックス A-50 カラム (1.5×20 cm)

*m) にかけた。75 mM KClを含むバッファAでカラムを洗浄後、100 mM KClを含むバッファAで溶出し、次に125 mM KClを含むバッファAで溶出した。CCADの主要部は、125 mM KClを含むバッファAで溶出された。回収したCCAD画分を、バッファAで平衡化されたハイドロキシアパタイト カラム (5×7 cm) にかけた。15 mM phosphateを含むバッファAで洗浄後、CCADは、30 mM phosphateを含むバッファAで溶出された。最終的には、ammonium sulphate により、CCADを結晶化させた (図5)。

【0036】CCAD精製の概要を、表4に示した。CCADは、粗抽出液から38倍に精製され、全収率の28%の回収率で得られた。日立 分析用超遠心機 SCP85H を用いて、20℃、60,000 rpmの条件下に、CCADの沈降パターンを10分ごとに測定した結果、見掛けの沈降速度が3.0 sの対称ピークであり、大雑把に言って、CCADの分子量は60 kDaに相当することが示された (図6の(A))。SDS-PAGEの結果からは、分子量29,000の2つの同一サブユニットから構成されていることが明らかにされた (図6の(B))。

【0037】

【表4】

Step	Total protein (mg)	Total activity* (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell-free extract	10,100	123	0.012	1	100
DEAE-cellulose	2,850	108	0.038	3	88
Sephadex A-50	1,681	97	0.056	5	79
Hydroxyapatite	190	76	0.400	33	62
Crystallization	74	34	0.460	38	28

*Cyclopentanol oxidation in the presence of NAD was measured.

【0038】なお、図6のレーン2は無細胞抽出液 (20 μ g protein)、レーン3はDEAEセルロースによる精製後 (15 μ g protein)、レーン4はDEAEセファデックス A-50による精製後 (10 μ g protein)、レーン5はハイドロキシアパタイトによる精製後 (5 μ g protein)、レーン6は最初の結晶化後 (5 μ g protein) の結果である。また、レーン1はサイズマーカーのバンドであり、phosphorylase b (110 kDa)、bovine serum albumin (77 kDa)、ovalbumin (50.5 kDa)、carbonic anhydrase (35.2 kDa)、soybean trypsin inhibitor (29.1 kDa)、lysozyme (14.4 kDa) を用いた。

【0039】

【実施例7】CCADの基質特異性を、表3に示した。※50

※CCADは、50 mM グリシン-NaOH中で試験した時、8.5-10.0というアルカリ性のpH条件下に、環状アルコールを酸化した。CCADは環状アルコールを酸化したが、環状アルコールの酸化における基質特異性に関しては、MCADよりも狭かった (表3)。CCADは、2-ブタノール (2-butanol) を良く酸化することから、2級アルコールの脱水素酵素と考えられる。結晶化したCCADは、シクロペンタノールに対して0.45 units/mg protein という比活性を示したが、膜結合型のMCADのシクロペンタノールに対する比活性 (44.3 units/mg protein) と比較すると、約100倍も低い値であった。

【0040】低いミハエリス定数を有する、細胞質内のNAD(P) 依存性酵素は、偶然に細胞質中に発生した

毒性化合物の急速なる排除システムを反映していると考えられる。もちろん、本発明に用いられたシクロペンタノールやシクロヘキサノールは、天然に高濃度で存在するものではない。従って、シクロペンタノールやシクロヘキサノールは、CCADの真の、そして現実の基質であると考えべきである。

【0041】シクロヘキサノールおよびNADに対する、CCADの見掛けのミハエリス定数は、それぞれ7 mMおよび73 μ Mと測定された。また、シクロヘキサノン (cyclohexanone) およびNADHに対する、CCADの見掛けのミハエリス定数は、それぞれ18 mMおよび0.4 mMと測定された。

【0042】一方で、CCADによる環状ケトンの還元は、50 mM 酢酸ナトリウム中で試験した時、pH5.0という酸性の条件下で、最も高い活性を示した。このようにCCADは、シクロヘキサノンに対して高い反応性を有しており、対応する環状アルコールであるシクロヘキサノールへと容易に還元された。以上の結果から、本発明のMCADと従来のCCADとは、全く異なる酵素であることが証明された。

【0043】休止期の細胞または細胞膜画分と基質の環状アルコールとを混合した場合は、短時間で環状アルコールは対応する環状ケトンに変換された。その変換速度は、NAD依存性のCCADによる反応速度とは比較できない程に大きなものであった。従って、CCADは酸化発酵に対していかなる貢献もないことを示しており、膜結合型のMCADだけが機能していることを明らかに

することができた。

【0044】

【発明の効果】本発明者らは、好気性細菌の細胞膜に、PQQを補酵素とする酸化活性の存在を初めて指摘し、酢酸菌等の好気性細菌を含む100株以上の細胞株を対象として、膜結合型の環状アルコール脱水素酵素産生株のスクリーニングを行った。その結果、グルコノバクター属の酢酸菌の細胞膜に存在する、従来のCCADの100倍も高い活性を有する膜結合型環状アルコール脱水素酵素 (MCAD) を見出し、初めて可溶化、精製した。

【図面の簡単な説明】

【図1】EDTA処理後の *Gluconobacter frateurii* CHM 9 株からの MCAD が、PQQおよびCaCl₂により再活性化されることを示す図である。

【図2】*Gluconobacter frateurii* CHM 9 株からの MCAD の分別可溶化を示す図である。

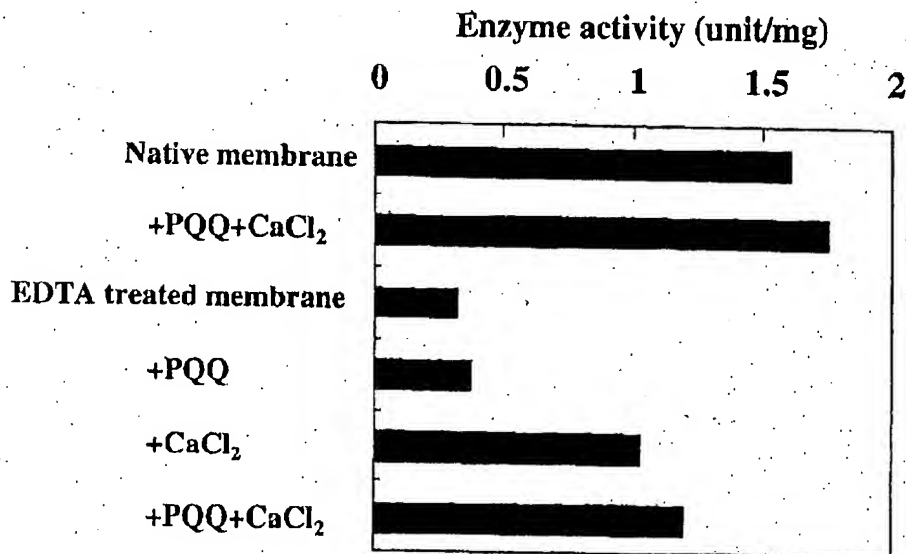
【図3】*Gluconobacter frateurii* CHM 9 株からの MCAD の、CM-トヨパールカラム クロマトグラフィーからの溶出プロファイルを示す図である。

【図4】*Gluconobacter frateurii* CHM 9 株からの MCAD の、SDS-PAGEの結果を示す図である。

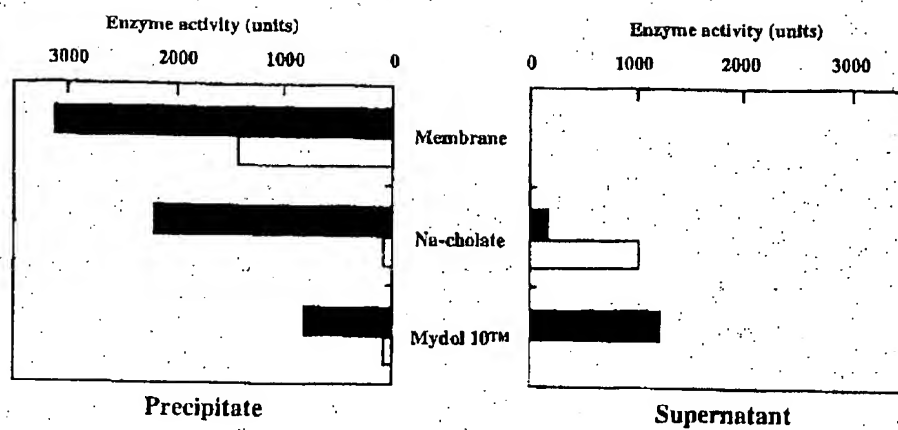
【図5】*Gluconobacter frateurii* CHM 9 株からの CCAD の結晶形を示す図である。

【図6】*Gluconobacter frateurii* CHM 9 株からの CCAD の純度を示す図である。

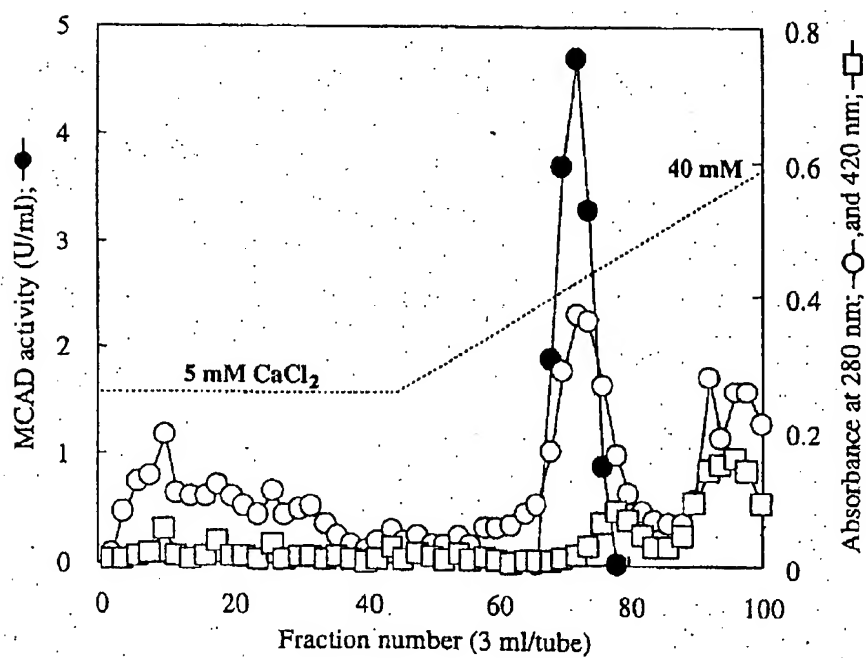
【図1】



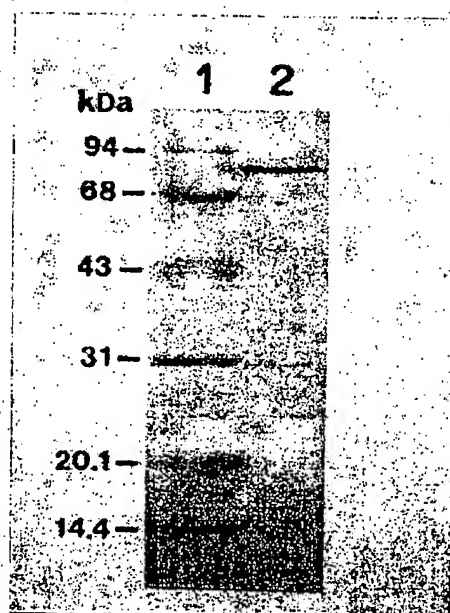
【図2】



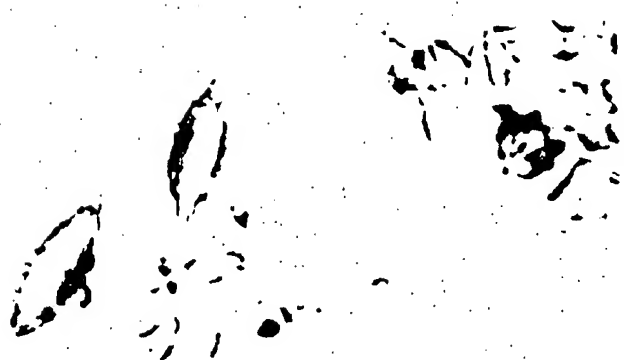
【図3】



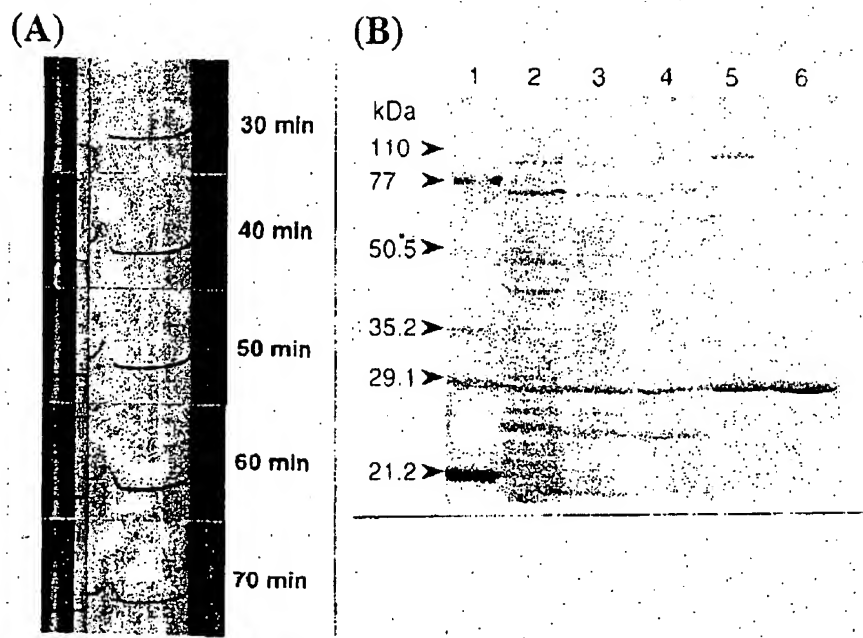
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 外山 博英
山口県山口市大字吉田1677番1号 山口大
学農学部
(72)発明者 ガンジャナ テーラグール
タイ王国バンコック10900 カセサート大
学

(72)発明者 チュアングティップ ムーンマンミー
タイ王国バンコック10140 キンモンクッ
ト工科大学トンブリ校
Fターム(参考) 4B050 CC01 CC07 DD02 FF09 FF11
FF12 LL05
4B064 AC09 AC31 CA21 CB13 CB28
DA16